

Estudo dirigido (Informação nos Capítulos 4 e 7 do livro *Molecular Biology of the Cell* 5ta. e 6ta. edição.)

Considerando organismos eucariotas

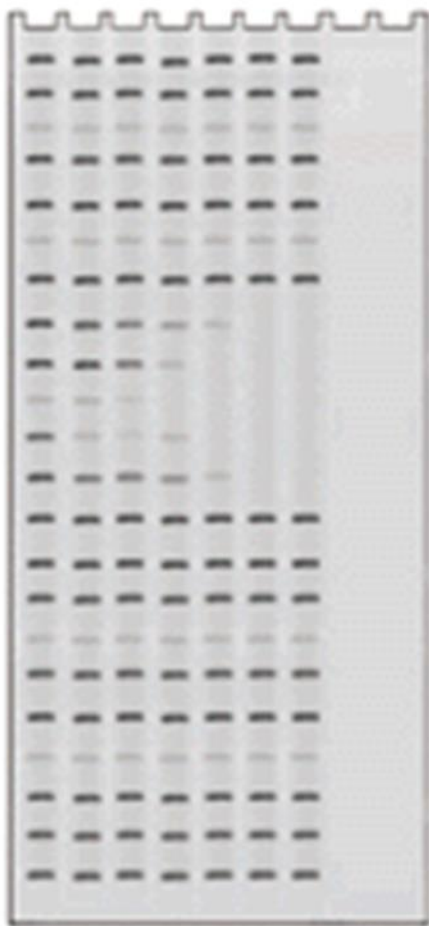
- 1- Defina gene.
- 2- Indique todas as regiões que compõem um gene.
- 3- Qual o princípio básico através do qual os organismos multicelulares são capazes de gerar dezenas de tipos diferentes?
- 4- O que é um elemento regulatório em *cis*. Procure exemplos.
- 5- O que é um elemento regulatório em *trans*. Qual a sua origem? Como ele funciona? Qual é a estrutura básica de um elemento deste tipo?
- 6- O que é a sequencia consenso de um fator de transcrição? Como variações na mesma podem afetar a expressão de genes?
- 7- O que é cromatina? Como ela é composta? Qual a origem do nome “cromatina”?
- 8- Descreva os diferentes níveis de empacotamento do DNA. Da dupla fita de DNA até o cromossomo mitótico. Identifique os elementos envolvidos e o grau de compactação da molécula de DNA em cada nível.
- 9- Descreva a diferença entre eucromatina e heterocromatina. Quais são os principais mecanismos moleculares que regulam a transição entre a conformação aberta e fechada da cromatina? Como isso influencia a expressão de um gene?
- 10- Como a metilação de uma região do DNA pode regular a expressão da mesma?

Exercícios

1- O resultado presente na figura 1 foi obtido após corrida eletroforética do produto da digestão de um oligonucleotídeo de DNA marcado radioativamente na extremidade 5' com DNase I na presença de concentrações crescentes de um extrato proteico nuclear obtido a partir de uma cultura celular. Nas condições utilizadas é esperado que a DNase I produza apenas um corte por molécula de DNA.

Visando confirmar o resultado obtido e descrito acima foi realizado um segundo ensaio. Desta vez o mesmo oligonucleotídeo, marcado radioativamente, foi incubado com concentrações iguais do mesmo extrato nuclear na presença do anticorpo indicado. Os resultados obtidos podem ser visualizados na figura 2.

a- Explique e discuta os resultados observados (Dicas: Estudar o princípio do ensaio de *foot-printing*. ajuda a pensar olhar o exercício #5).



[] de extrato nuclear

Figura - 1

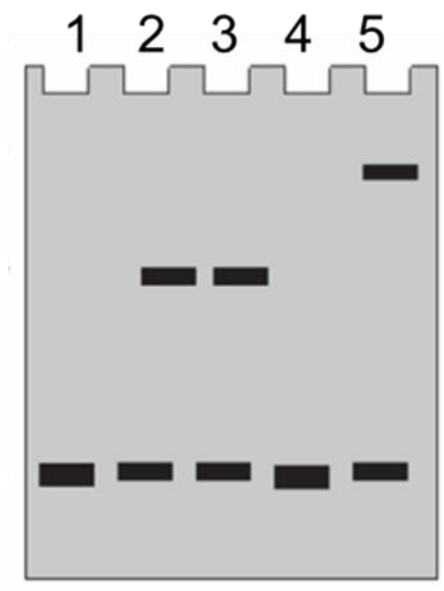


Figura - 2

- 1- Oligonucleotídeo
- 2 – Oligo + extrato nuclear
- 3 - Oligo + extrato + Anticorpo anti cJun
- 4- Oligo + Anticorpo anti cMyc
- 5- Oligo + extrato + Anticorpo anti cMyc

Biologia Molecular e Celular III – Regulação da Expressão gênica I

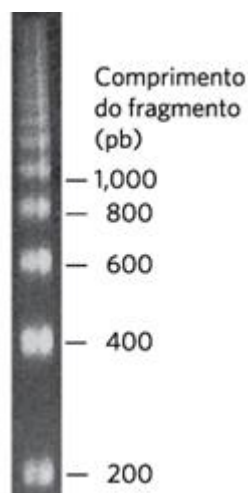
2- Foi produzida uma biblioteca de expressão a partir de cDNA obtido de uma cepa de levedura recentemente identificada. As sequencias de cDNA foram clonadas à montante da sequencia que codifica para o domínio de ligação ao DNA do fator de transcrição GAL4 para gerar uma proteína de fusão. Esta biblioteca foi utilizada para transformar outra cepa de leveduras (gal4-) junto a dois plasmídeos: um que codifica uma proteína de fusão entre a proteína p53 e o domínio de transactivação do fator de transcrição GAL4 e outro que codifica a proteína GFP (*green fluorescent protein*) sob controle de um promotor responsivo a GAL4. Após o experimento foram obtidas 7 colônias que expressam GFP. (Dica: pesquise sobre o princípio do ensaio de Duplo híbrido em leveduras)

- a- Explique o resultado observado.
- b- Explique a lógica da técnica empregada.
- c- Discuta a utilidade da mesma.

3 – Considerando a sequencia do promotor de um gene eucariota proponha um experimento que permita determinar a presença de histonas e de fatores de transcrição específicos na região. Se possível, determinar se as histonas apresentam alterações específicas. (Dica: pesquise sobre o princípio do ensaio de imunoprecipitação de cromatina [Chip])

4 - Descreva um experimento para determinar se um fator de transcrição se encontra ativo dentro de uma célula. (Dica: pesquise sobre o princípio do ensaio de *gene reporter*)

5 - Uma preparação de cromatina obtida de uma cultura de células epiteliais foi digerida com nuclease de micrococo (digere DNA de maneira inespecífica). Após a digestão a preparação foi aplicada em um gel de agarose dando como resultado o seguinte padrão de bandas:



- a) Defina cromatina e indique seus principais componentes.
- b) Descreva brevemente os diferentes níveis de empacotamento da cromatina.
- c) Explique o resultado apresentado na figura. (Dica: lembre-se da estrutura do nucleossomo e de como isso afeta a acessibilidade de proteínas ao DNA)